

# SQF-40, NUEVO COMPUESTO ANTIBACTERIANO PRODUCIDO POR *STREPTOMYCES RESISTOMYCIFICUS*. REPORTE PRELIMINAR

A. Niebla, L. González, I. González, N. Montes y C. Vallín.

Centro de Química Farmacéutica, Avenida 21 y 200, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 4 de abril de 1994.

**RESUMEN.** Como resultado de un programa desarrollado para la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana, se aisló una cepa de *Streptomyces sp.* productora de un compuesto (SQF-40) con actividad antibiótica de amplio espectro, la cual fue identificada como *Streptomyces resistomycificus*. SQF-40 resultó activo contra 35 de 41 cepas de bacterias estudiadas; inhibió el crecimiento de microorganismos Gram positivos y negativos y micobacterias. Por otra parte, mostró buena actividad contra hongos y fue ligeramente activo contra levaduras. Se conocen sólo dos compuestos con actividad biológica producidos por *S. resistomycifus* cuyas propiedades químicas difieren sustancialmente de las propiedades de SQF-40, lo que permite inferir que este compuesto, resulta un antibacteriano no descrito para esta especie.

**ABSTRACT.** From a program developed for the search of substances with antibacterial activity, a strain of *Streptomyces* that produces a compound with broad spectrum antibiotic activity (SQF-40) was isolated, and identified as *Streptomyces resistomycificus*. SQF-40 was active against 35 out of 41 strains of bacteria studied. It inhibited the growth of Gram positive and negative microorganisms, and mycobacterias. This compound showed good activity against fungi and was slightly active against yeasts. So far, only two compounds with biological activity produced by *S. resistomycificus* have been reported. These compounds differ completely from SQF-40 with regards to chemical properties, so it suggests that SQF-40 is a new antibacterial compound reported for the first time in this species.

## INTRODUCCION

Desde el descubrimiento de la penicilina, alrededor de 6 000 nuevos antibióticos han sido aislados de diferentes microorganismos, la mayoría a partir del género *Streptomyces*.<sup>1,2</sup> Sin embargo, sólo una pequeña parte ha sido utilizada desde el punto de vista clínico.<sup>3</sup> El surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos ya establecidos, ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos más eficientes para el tratamiento de ciertas infecciones, especialmente aquellas provocadas por bacterias.<sup>3-6</sup> Como resultado de un programa desarrollado para la búsqueda de sustancias con actividad biológica, se aisló una cepa de *Streptomyces sp.* productora de un compuesto antibacteriano de amplio espectro que fue denominado SQF-40.

La caracterización taxonómica de esta cepa y la determinación del espectro de actividad antibiótica del compuesto SQF-40, constituyeron el objetivo fundamental de este trabajo.

## MATERIALES Y METODOS

La cepa productora se obtuvo a partir de la siembra de una muestra de suelo, siguiendo el método de las diluciones seriadas y empleando como medio de cultivo agar-avena al 2 % (ISP-3).<sup>7</sup> La incubación se realizó durante 7 días a 28 °C.

### Taxonomía

Las características morfológicas y fisiológicas del microorganismo productor se determinaron, utilizando los medios y métodos descritos en el Proyecto Internacional de *Streptomyces* (ISP).<sup>7</sup>

Todas las observaciones fueron realizadas durante los primeros 21 días de incubación a 28 °C.

La clasificación del color del micelio aéreo y vegetativo fue asignada de acuerdo con la guía de colores y números de

Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards Centroid Color Charts.<sup>8</sup>

El análisis químico de la pared celular se realizó siguiendo el método descrito por Becker y colaboradores.<sup>9</sup>

La utilización de diferentes fuentes de carbono fue examinada en medio ISP-9<sup>10</sup>, cuyos resultados fueron observados después de 14 días de incubación a 28 °C.

### Fermentación

Se partió de una suspensión de esporas en glicerol al 20 % a partir de la cual se transfirió 1 mL a 50 mL del medio-inóculo que contenía: extracto de carne 0,25 %, triptona 0,4 %, harina de soya 0,5 %, glucosa 0,2 %, almidón soluble 2,5 %, extracto de levadura 0,3 % y carbonato de calcio 0,5 % y que presentaba pH 7. La incubación se realizó a 28 °C con una agitación de 200 r/min y durante 48 h. Posteriormente, se transfirieron 5 mL del micelio vegetativo a 100 mL del medio de producción que fue preparado de la forma siguiente: dextrina 4 %, glucosa 0,4 %, carbonato de calcio 0,5 %, harina de soya 2,2 %, y cloruro de calcio al 2 %, a pH 7. Se incubó durante 96 h a 28 °C a 50 r/min de agitación.

### Actividad biológica

Los ensayos de actividad biológica se realizaron a partir del sobrenadante del caldo de fermentación después de centrifugado a 3000 r/min durante 30 min.

El caldo de producción se enfrentó a un grupo de bacterias Gram positivas y negativas, bacilos ácido-alcohol resistentes, levaduras y hongos, incluyendo cepas de colección y cepas salvajes patógenas con un espectro amplio de resistencia antibiótica.

Para el ensayo con bacterias se tomaron de dos a tres colonias provenientes de cultivos de 24 h crecidos en placas de agar nutriente y se transfirieron a 5 mL de caldo Mueller-Hinton. Posteriormente, se incubaron de 1 a 3 horas a 37 °C hasta

que el medio alcanzó una densidad óptica de 0,5 en la escala McFarland.

La prueba de susceptibilidad antibiótica se realizó en placas de agar Mueller-Hinton, las cuales fueron sembradas por profundidad a razón de  $1.10^6$  células por mL a partir de los cultivos en medio líquido. Se abrieron pozos de 3 mm de diámetro en el agar y se añadieron 20  $\mu$ L del caldo de fermentación. Posteriormente, se dejó difundir el caldo en el agar durante 30 min a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C, excepto para el género *Serratia* el cual se incubó a temperatura ambiente.

En el ensayo con micobacterias se empleó como medio líquido caldo nutriente 0,8 %, extracto de levadura 0,1 %, glicerol 2 %, tween-80 0,7 %, y el ensayo en placas se realizó en agar nutriente con glicerol 2% y tween-800,7 %. La incubación se realizó a 30 °C durante 72 h.

Cuando se emplearon levaduras el medio líquido utilizado fue sabouraud-maltosa. El ensayo en placas se realizó en medio sabouraud-dextrosa pH 5,6 y se incubó a 28 °C durante 48 h.

En el caso de los hongos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, se inoculó a partir de una suspensión de esporas conservada en glicerol al 20% y para *Fusarium sp.* a partir de una suspensión de micelio joven fragmentado. El medio para el ensayo en placas fue agar Czapeck y en el caso de *Fusarium sp.* se empleó el medio ISP-3.

En todos los casos, la aparición de un halo de inhibición del crecimiento, se tomó como criterio de sensibilidad al compuesto.

Para una mejor caracterización del metabolito con actividad antibiótica se realizaron dos pruebas adicionales: termoestabilidad y estabilidad en medio ácido.

### Termoestabilidad en medio ácido

Cinco mililitros del caldo de producción y de dos patrones de antibióticos aminoglucósidos: kanamicina y estreptomycin (0,1 mg/mL) fueron ajustados a pH 3 con HCl 0,1 mol/L y se sometieron a 121 °C durante 60 min en una autoclave.

Después del tratamiento, a las tres soluciones se les ajustó el pH a 7 y se determinó actividad biológica empleando *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Se realizó un control de actividad biológica de las tres soluciones antes del tratamiento.

### Estabilidad a pH

A muestras de 5 mL de caldo se les ajustaron diferentes pH (3,7,10) y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 h. Después, se ajustó a pH 7 y se determinó actividad biológica con el *B. subtilis* ATCC 6633.

Se realizó un control de actividad biológica de las tres soluciones antes del tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Taxonomía

Las propiedades morfológicas y culturales que se observaron en la cepa fueron las siguientes:

El micelio aéreo está constituido por esporoforos que forman espirales abiertos con diez o más esporas por cadena. Las esporas son cilíndricas y de superficie lisa.

El micelio vegetativo fue de color carmelita-rojizo en la mayoría de los medios de cultivo utilizados, mientras que el micelio aéreo fue de color gris (Tabla I).

**TABLA I**  
**Características culturales de la cepa SQF-40**

Medio	Crecimiento	Micelio aéreo	Micelio sustrato	Pigmento soluble
Agar extracto de levadura-extracto de malta	bueno	abundante gris-malva	carmelita-rojizo	no tiene
Agar avena (ISP-3)	bueno	moderado rosado-gris	carmelita-rojizo	no tiene
Agar almidón sales inorgánicas (ISP-4)	bueno	abundante rosado-gris	amarillo-gris a amarillo-rojizo débil	no tiene
Agar glicerol asparagina (ISP-5)	bueno	abundante rosado-gris	amarillo-gris	no tiene
Agar peptona hierro-extracto de levadura (ISP-6)	pobre	no tiene	carmelita	carmelita
Agar tirosina (ISP-7)	pobre	no tiene	negro	negro
Agar glucosa asparagina	pobre	no tiene	blanco	no tiene
Agar nutriente	pobre	no tiene	carmelita-amarillo	no tiene
Pedazos de papa	bueno	pobre carmelita-grisoso	carmelita-oscuro	carmelita

No se detectó la producción de pigmento difusible.

Se observó producción de pigmento melanoide en medio agar-tirosina y agar-peptona-hierro-extracto de levadura.

La temperatura óptima de crecimiento fue ensayada en agar extracto de malta-extracto de levadura, mostrando un crecimiento óptimo entre 27 y 34 °C. La hidrólisis del almidón

y la coagulación y peptonización de la leche fueron positivas, pero la reducción de los nitratos fue negativa.

El análisis químico de la pared celular mostró la presencia de ácido L-diaminopimélico.

La cepa mostró asimilación de diferentes fuentes de carbono: D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, inositol, manitol, D-

fructosa, L-ramnosa, sacarosa. La asimilación de la rafinosa resultó dudosa.

De acuerdo con las características que se conocen acerca del género *Streptomyces*<sup>11,12</sup> y un análisis integral de las propiedades culturales, morfológicas y fisiológicas de la cepa SQF-40, ésta fue ubicada dentro de este género.

Para su clasificación específica la cepa SQF-40 se comparó con varias especies del género *Streptomyces* ya descritas.

Se consideró a la especie *Streptomyces resistomycificus* muy cercana a la cepa productora.

La cepa SQF-40f ue comparada con la cepa de colección *Streptomyces resistomycificus* IFO 12814 (Tabla II). Las diferencias observadas entre los dos microorganismos fueron relativas a la coagulación de la leche y la utilización de rafinosa. La cepa fue identificada como *Streptomyces resistomycificus*.

**TABLA II**  
**Comparación de la cepa SQF-40 con *Streptomyces resistomycificus* IFO 12814**

Características	Cepa SQF-40	<i>S. resistomycificus</i> IFO 12814
Color del micelio aéreo	gris	gris
Superficie de la spora	lisa	lisa
Pigmentos melanoides	positivo	positivo
Tolerancia al cloruro de sodio	>3% y < 4%	>3% y < 7%
Hidrolisis del almidón	positivo	positivo
Peptonización de la leche	positivo	positivo
Coagulación de la leche	positivo	negativo
Utilización de sacarosa	positivo	positivo
Utilización de D-xilosa	dudoso	positivo
Utilización de fructosa	positivo	positivo
Utilización de rafinosa	negativo	dudoso
Utilización de L-ramnosa	positivo	positivo
Utilización de L-arabinosa	positivo	positivo

Esta cepa actualmente se encuentra depositada en la colección de *Streptomyces* del Departamento de Biotecnología del Centro de Química Farmacéutica .

### Actividad biológica

El antibiótico se mostró activo contra 35 de 41 cepas de bacterias ensayadas (Tabla III). Inhibió el crecimiento tanto de microorganismos Gram positivos como negativos y resultó inactivo contra el género *Pseudomonas sp.* De cinco cepas pertenecientes al género *Mycobacterium* fue activo frente a tres y mostró buena actividad contra hongos, así como cierta actividad contra levaduras.

Se obtuvo un aumento en el halo de inhibición para los patrones de antibióticos aminoglucosidos y una disminución para el caldo en reducción (Tabla V). En el caso de los patrones el comportamiento fue el esperado, pues se conoce que los aminoglucósidos se activan después del tratamiento con calor,<sup>13</sup> además, son muy termoestables en medio ácido.<sup>13</sup>

El caldo de producción a pesar de mantener actividad después del tratamiento térmico en medio ácido (lo cual excluyó un gran número de antibióticos), sufrió una inactivación parcial, comportamiento característico de los antibióticos del grupo de las estreptotricinas.<sup>13</sup>

Se mantuvo la actividad biológica en medio ácido, neutro, y básico e incluso se observó un ligero incremento en el primero, lo cual es característico de los grupos de antibióticos aminoglucósidos y estreptotricinas (Tabla V).

Una integración de los resultados indicó la presencia de un compuesto relacionado con las familias: aminoglucósidos

y estreptotricinas. La prueba de termoestabilidad en medio ácido resultó excluyente para los grupos de antibióticos β-lactámicos, bleomicinas, péptidos, etcétera.<sup>13</sup>

El empleo de cromatografía de capa fina, utilizando reveladores específicos para aminoglucósidos, no demostró la presencia de este grupo de antibióticos en el caldo de fermentación, lo que inclinó a pensar en antibióticos del grupo de las estreptotricinas.

Las cepas productoras de estreptotricinas que actualmente se conocen, permiten agrupar los actinomicetos siguientes (con exclusión de *S. resistomycificus*):

- Streptomyces lavendulae*: estreptotricina B, C, D y F<sup>14</sup>
- S. roceochromogenes*: estreptotricina D y F<sup>14</sup>
- S. racemochromogenes*1: estreptotricina C, D, E y F<sup>14</sup>
- S. xantophaceus*: estreptotricina A, B, C, D y F<sup>14</sup>
- S. noursei*: estreptotricina C, D y F<sup>14</sup>
- S. glaucus*: complejo de estreptotricinas<sup>15</sup>
- S. griseus*: complejo de estreptotricinas<sup>16</sup>
- S. rochei*: complejo de estreptotricinas<sup>17</sup>
- S. lavendofoliae*: complejo de estreptotricinas<sup>12</sup>
- Actinomyces griseus*: estreptotricina C, D y F<sup>14</sup>
- A. polymycin*: estreptotricina A, B, C, D, F y X<sup>14</sup>
- A. luridus*: estreptotricina F<sup>14</sup>

Entre los años 1953 al 1993, sólo se conocen dos compuestos con actividad biológica producidos por *S. resistomycificus*: el *resistomicin*<sup>18</sup> y un inhibidor de la enzima leucocitelastrasa.<sup>19</sup> El primero, difiere grandemente del SQF-40 en sus propiedades químicas y el segundo, no presenta actividad antibiótica.

**TABLA III**  
**Actividad biológica del antibiótico SQF-40 frente a bacterias, levaduras y hongos**

Especie	Total de cepas	Actividad del caldo	
		Cepas sensibles	Cepas resistentes
<b>BACTERIAS</b>			
<i>Escherichia coli</i>	2020		—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44		—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4—4		
<i>Serratia marcescens</i>	11		—
<i>Proteus mirabilis</i>	11		—
<i>Alcaligenes faecalis</i>	11		—
<i>Staphylococcus aureus</i>	11		—
<i>Micrococcus luteus</i>	11		—
<i>Bacillus subtilis</i>	11		—
<i>Bacillus cereus</i>	22		—
<i>Mycobacterium perpalidum</i>	11		—
<i>Mycobacterium taurus</i>	11		—
<i>Mycobacterium armentum</i>	11		—
<i>Mycobacterium vaccae</i>	1—1		
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1—1		
TOTAL	41	35	6
<b>LEVADURAS</b>			
<i>Candida albicans</i>	1—1		
<i>Candida tropicalis</i>	1—1		
<i>Candida pseudo-tropicalis</i>	11		—
<i>Candida guillemondii</i>	11		—
TOTAL	4	2	2
<b>HONGOS FILAMENTOSOS</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	11		—
<i>Penicillium sp.1</i>		1	—
<i>Fusarium sp.1</i>		1	—
TOTAL	3	3	—

**TABLA IV**  
**Prueba de termoestabilidad del antibiótico SQF-40 en medio ácido**

Antibiótico	Tratamiento	
	Antes	Después
	Tamaño del halo de inhibición (mm)	
Kanamicina A	6	9
Estreptomicina	6	9
SQF-40	17	13

**TABLA V**  
**Actividad del antibiótico SQF-40 después de ser incubado a diferentes valores de pH**

Réplicas del caldo	pH		
	37	10	
	Tamaño del halo de inhibición (mm)		
1	171	51	3
2	141	51	2
3	141	51	3

## CONCLUSIONES

Las características taxonómicas de la cepa aislada SQF-40p ermiten ubicarla dentro del género *Streptomyces* sp. y clasificarla como *S. resistomycificus*.

El metabolito SQF-40, producido por esta especie, es un compuesto activo contra bacterias Gram positivas y negativas, bacilos ácido-alcohol resistentes y hongos.

Los hechos y evidencias discutidos permiten considerar la posibilidad de haber encontrado un antibiótico cuya producción por *Streptomyces resistomycificus* no ha sido reportada hasta el momento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Reynes J. P. **Journal of Gen. Microbiol.**, **134**, 585, 1988.
  2. Hotta K., Ishikawa J., Ogata T. and Mizuno S. **Gene**, **115**, 113, 1992.
  3. Hoopwood D. A. **Phil. Trans. R. Soc., London**, **324**, 549, 1989.
  4. Leclercq R., Bismuth R. and Duval J. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **11**, 356, 1992.
  5. Shaw K J. and Hare R. S. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **35**, 2253, 1991.
  6. Jacoby G. A. and Gordon L. A. **New England Journal of Medicine**, **324**, 601, 1991.
  7. Shirling E. B. and Gottlieb D. **Int. J. Sys.**, **16**, 313, 1961.
  8. Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards Centroid Color Charts. U.S. Dept. of Commerce National Bureau of Standards Supplement to NBS, Circular 553, 1985.
  9. Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E. and Lechevalier H.A. **Appl. Microbiol.**, **12**, 421, 1964.
  10. Pridham T. G. and Gottlieb D. J. **Bacteriology**, **56**, 107, 1948.
  11. Waksman S. A. (Ed.) The Actinomycetes. Vol. 2. Classification, Identification and Descriptions of General and Species. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 20-25, 1961.
  12. Stanley T. W. (Ed.) Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, Vol. 4, 2451-2492, 1989.
  13. Etienne G., Armau E. and Tiraby G. **J. Antibiotics**, **44**, 1357, 1991.
  14. Khokhlov A. S. ,J. of Chromatography library. Isolation, separation and purification. Ed. Marvin J. Weinstein, Gerald Wagman H. ESPC. Amsterdam-Oxford, NW.,Vol. 15, 617-630, 1978.
  15. Preobrazhenskaya T. P. **Antibiotiki I Meditsinskaya Biotekhnologiya**, **31**, 1136. 1986.
  16. Kuklin V. **Antibiotiki I Meditsinskaya Biotekhnologiya**, **28**, 883, 1983.
  17. Kartar S. J. **Antibiotics**, **36**, 1770, 1983.
  18. Patentschrift, Deutsches Patentamt No. 888918, 1953.
  19. European Patent Application No. 90104500, 5, 1990.
-